

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/018501

International filing date: 10 December 2004 (10.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2003-415758  
Filing date: 12 December 2003 (12.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 24 March 2005 (24.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

14.12.2004

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2 0 0 3 年 1 2 月 1 2 日

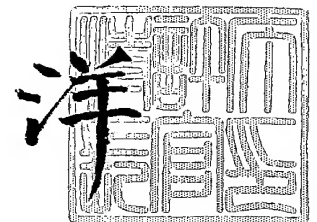
出 願 番 号  
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 4 1 5 7 5 8  
[ST. 10/C]: [ J P 2 0 0 3 - 4 1 5 7 5 8 ]

出 願 人  
Applicant(s): 中 外 製 薬 株 式 有 限 公 司

2 0 0 5 年 3 月 1 0 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



出証番号 出証特 2 0 0 5 - 3 0 0 3 3 9 0

【書類名】 特許願  
【整理番号】 C1-A0323  
【提出日】 平成15年12月12日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【発明者】  
    【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 - 2 中外製薬株式会社内  
    【氏名】 木村 直紀  
【発明者】  
    【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 - 2 中外製薬株式会社内  
    【氏名】 織田 哲郎  
【発明者】  
    【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内  
    【氏名】 土屋 政幸  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000003311  
    【氏名又は名称】 中外製薬株式会社  
【代理人】  
    【識別番号】 100102978  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 清水 初志  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100108774  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 橋本 一憲  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 041092  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1  
    【包括委任状番号】 0216136

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

2つの重鎖可変領域及び2つの軽鎖可変領域を含み、ヒト白血球抗原(HLA)への結合活性を有する一本鎖ポリペプチドであることを特徴とする抗体。

**【請求項 2】**

2つの重鎖可変領域及び2つの軽鎖可変領域が、一本鎖ポリペプチドのN末端側を基点として重鎖可変領域、軽鎖可変領域、重鎖可変領域、軽鎖可変領域の順に並んでいることを特徴とする、請求項 1 に記載の抗体。

**【請求項 3】**

2つの重鎖可変領域及び2つの軽鎖可変領域がリンカーで結合されていることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の抗体。

**【請求項 4】**

リンカーが15アミノ酸であることを特徴とする、請求項 3 に記載の抗体。

**【請求項 5】**

HLAがHLA class Iである、請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の抗体。

**【請求項 6】**

HLA class IがHLA-Aである、請求項 5 に記載の抗体。

**【請求項 7】**

sc(Fv)2である請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の抗体。

**【請求項 8】**

配列番号：3、4、5 に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する重鎖可変領域を含むsc(Fv)2。

**【請求項 9】**

配列番号：6、7、8 に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する軽鎖可変領域を含むsc(Fv)2。

**【請求項 10】**

配列番号：3、4、5 に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する重鎖可変領域および配列番号：6、7、8 に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する軽鎖可変領域を含むsc(Fv)2。

**【請求項 11】**

配列番号：10 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含むsc(Fv)2。

**【請求項 12】**

配列番号：12 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含むsc(Fv)2。

**【請求項 13】**

配列番号：10 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域および配列番号：12 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含むsc(Fv)2。

**【請求項 14】**

配列番号：14 に記載のアミノ酸配列を有するsc(Fv)2。

**【請求項 15】**

配列番号：2 に記載のアミノ酸配列を有するsc(Fv)2。

**【請求項 16】**

請求項 8 ～ 15 のいずれかに記載のアミノ酸配列において1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入され、かつ請求項 8 ～ 15 のいずれかに記載の抗体と同等の活性を有するsc(Fv)2。

**【請求項 17】**

請求項 1 ～ 16 のいずれかに記載の抗体をコードするポリヌクレオチド。

**【請求項 18】**

請求項 17 に記載のポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ請求項 1 ～ 16 のいずれかに記載の抗体と同等の活性を有する抗体をコードするポリヌクレオチド。

**【請求項 19】**

請求項 17 または 18 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

**【請求項 20】**

請求項 17 または 18 に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 19 に記載のベクターを保持する宿主細胞。

**【請求項 21】**

以下の工程を含む請求項 1 ～ 16 のいずれかに記載の抗体を作製する方法。

- (a) HLA を認識する抗体を調製する工程
- (b) (a) で調製した抗体の配列を基に、請求項 1 ～ 16 のいずれかに記載の抗体をコードするポリヌクレオチドを作製する工程
- (c) (b) のポリヌクレオチドを含むベクターを作製する工程
- (d) (c) のベクターを宿主細胞に導入する工程
- (e) (d) の宿主細胞を培養する工程

**【請求項 22】**

請求項 1 ～ 16 のいずれかに記載の抗体を有効成分として含有する、細胞死誘導剤。

**【請求項 23】**

B 細胞又は T 細胞に対する細胞死誘導であることを特徴とする、請求項 22 に記載の細胞死誘導剤。

**【請求項 24】**

B 細胞又は T 細胞が、活性化 B 細胞又は活性化 T 細胞である、請求項 23 に記載の細胞死誘導剤。

**【請求項 25】**

請求項 1 ～ 16 のいずれかに記載の抗体を有効成分として含有する、細胞増殖抑制剤。

**【請求項 26】**

請求項 1 ～ 16 のいずれかに記載の抗体を有効成分として含有する、抗腫瘍剤。

**【請求項 27】**

腫瘍が血液腫瘍である請求項 26 に記載の抗腫瘍剤。

**【請求項 28】**

請求項 1 ～ 16 のいずれかに記載の抗体を有効成分として含有する、自己免疫疾患治療剤。

【書類名】明細書

【発明の名称】細胞死誘導剤

【技術分野】

【0001】

本発明は、HLAを認識する抗体のsc(Fv)2に関する。

【背景技術】

【0002】

HLA class I抗原は、3つのドメイン ( $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ ) からなる45KDの $\alpha$ 鎖と、12KDの $\beta 2$ ミクログロブリンのヘテロダイマーによって形成される。HLA分子の主な役割は、細胞の中で作られる8~10程度のアミノ酸でできた抗原ペプチドをCD8+T細胞に提示することであり、これによって誘導される免疫応答や免疫寛容に非常に重要な役割を担っている。

【0003】

また、HLA class IA抗原の抗体によるライゲーシオンで、細胞増殖抑制や細胞死誘導効果がリンパ球細胞において観察されており、HLA分子のシグナル伝達分子としての可能性も示唆されている。

【0004】

すなわち、例えばヒトHLA class IAの $\alpha 1$ ドメインに対する抗体B9.12.1、 $\alpha 2$ ドメインに対する抗体W6/32、 $\alpha 3$ ドメインに対する抗体TP25.99、A1.4は、活性化リンパ球に対して細胞増殖を抑制するとの報告がある（非特許文献1, 2）。また、 $\alpha 1$ ドメインに対する二種類の抗体MoAb90, YTH862は、活性化リンパ球に対してアポトーシスを誘導することが報告されている（非特許文献2, 3, 4）。この2つの抗体によって誘導されるアポトーシスはカスパーゼを介した反応であることが明らかにされており（非特許文献4）、このことからリンパ細胞で発現するHLA class IA抗原は、アポトーシスの信号伝達にも関与していると推測されている。

【0005】

さらに、ヒトHLA class IAの $\alpha 3$ ドメインに対する抗体 5H7（非特許文献5）、マウスHLA class IAの $\alpha 2$ ドメインに対する抗体RE2（非特許文献6）も、活性化リンパ球などに細胞死を誘導することが報告されている。しかしながら前出のアポトーシス誘導抗体MoAb90やYTH862とは違い、これらの抗体によって誘導される細胞死は、いずれもカスパーゼを介さないことが示されている。このことから、5H7やRE2による細胞死は、従来知られているアポトーシスの機構とはまったく異なるタイプの細胞死であると推測されている。

【0006】

以上のように、抗HLA抗体による細胞増殖抑制、細胞死誘導作用に関する報告はこれまで複数なされている。ただし、ここで利用されている抗体の分子形態はいずれもIgG抗体、もしくはF(ab')<sub>2</sub>、Fabであり、またF(ab')<sub>2</sub>やFabのように抗体を低分子化することで、細胞死誘導活性が上昇したとの知見は今のところない。

【0007】

一方2D7抗体は、ヒトミエローマ細胞をBalb/cマウスに免疫して得たマウスモノクローナル抗体である（非特許文献7）。これまで2D7抗体が、種々のリンパ系腫瘍細胞の細胞表面に高い特性を持って結合することは確認されていたが、2D7抗体が認識する抗原については同定されてはいなかった。

【0008】

なお、本出願の発明に関連する先行技術文献情報を以下に示す。

【非特許文献1】Fayen et al., Int. Immunol 10: 1347-1358(1998)

【非特許文献2】Genestier et al., Blood 90: 3629-3639 (1997)

【非特許文献3】Genestier et al., Blood 90: 726-735 (1997)

【非特許文献4】Genestier et al., J. Biol. Chem. 273: 5060-5066 (1998)

【非特許文献5】Woodle et al., J. Immunol. 158: 2156-2164 (1997)

【非特許文献6】Matsuoka et al., J. Exp. Med. 181: 2007-2015 (1995)

【非特許文献7】Goto, et al. Blood 84: 1922 (1994)

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0009】

本発明はこのような状況に鑑みて為されたものであり、その目的は、HLA class IAを認識する活性の高い抗体を提供することにある。詳しくは、2つの重鎖可変領域及び2つの軽鎖可変領域を含み、ヒト白血球抗原(HLA)への結合活性を有する一本鎖ポリペプチドであることを特徴とする抗体を提供することを目的とする。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0010】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究を行なった。2D7抗体は、徳島大学第一内科のグループにより患者由来leukemiaを免疫することにより得られたマウス抗体である。本発明者らは、2D7抗体が種々のリンパ系腫瘍細胞の細胞表面に高い特性を持って結合すること、また、2D7抗体がHLA-Aを認識することを見出し、特許出願を行った(PCT/JP03/13063(特願2002-299289号))。また、抗HLA抗体をDiabodyなどの低分子化抗体にすると細胞死誘導活性が上昇することも見出した(PCT/JP03/13063)。本発明者らは、抗体の活性を上昇させる為、さらに鋭意研究した結果、sc(Fv)2にすることにより非常に優れた活性を示すことを見出した。具体的には、2D7抗体の重鎖可変領域配列(VH)と軽鎖可変領域配列(VL)が、VH-VL-VH-VLの並びになるように、それぞれを15merのリンカーで接続した2D7sc(Fv)2をコードするDNA発現ベクターを構築し、該ベクターをCHO細胞に導入して2D7sc(Fv)2産生発現細胞株を樹立した。該細胞株で発現させた2D7sc(Fv)2を精製し、細胞死誘導実験を行なったところ、2D7sc(Fv)2は濃度依存的に細胞死を誘導する非常に優れた活性を有することが明らかになった。

## 【0011】

即ち、本発明は、2つの重鎖可変領域及び2つの軽鎖可変領域を含み、ヒト白血球抗原(HLA)への結合活性を有する一本鎖ポリペプチドであることを特徴とする抗体に関し、以下の〔1〕～〔28〕を提供するものである。

〔1〕2つの重鎖可変領域及び2つの軽鎖可変領域を含み、ヒト白血球抗原(HLA)への結合活性を有する一本鎖ポリペプチドであることを特徴とする抗体。

〔2〕2つの重鎖可変領域及び2つの軽鎖可変領域が、一本鎖ポリペプチドのN末端側を基点として重鎖可変領域、軽鎖可変領域、重鎖可変領域、軽鎖可変領域の順に並んでいることを特徴とする、〔1〕に記載の抗体。

〔3〕2つの重鎖可変領域及び2つの軽鎖可変領域がリンカーで結合されていることを特徴とする、〔1〕または〔2〕に記載の抗体。

〔4〕リンカーが15アミノ酸であることを特徴とする、〔3〕に記載の抗体。

〔5〕HLAがHLA class Iである、〔1〕～〔4〕のいずれかに記載の抗体。

〔6〕HLA class IがHLA-Aである、〔5〕に記載の抗体。

〔7〕sc(Fv)2である〔1〕～〔6〕のいずれかに記載の抗体。

〔8〕配列番号：3、4、5に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する重鎖可変領域を含むsc(Fv)2。

〔9〕配列番号：6、7、8に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する軽鎖可変領域を含むsc(Fv)2。

〔10〕配列番号：3、4、5に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する重鎖可変領域および配列番号：6、7、8に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する軽鎖可変領域を含むsc(Fv)2。

〔11〕配列番号：10に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含むsc(Fv)2。

〔12〕配列番号：12に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含むsc(Fv)2。

〔13〕配列番号：10に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域および配列番号：12に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含むsc(Fv)2。

〔14〕配列番号：14に記載のアミノ酸配列を有するsc(Fv)2。

〔15〕配列番号：2に記載のアミノ酸配列を有するsc(Fv)2。

〔16〕〔8〕～〔15〕のいずれかに記載のアミノ酸配列において1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入され、かつ〔8〕～〔15〕のいずれかに記載の抗体と同等の活性を有するsc(Fv)2。

〔17〕〔1〕～〔16〕のいずれかに記載の抗体をコードするポリヌクレオチド。

〔18〕〔17〕に記載のポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ〔1〕～〔16〕のいずれかに記載の抗体と同等の活性を有する抗体をコードするポリヌクレオチド。

〔19〕〔17〕または〔18〕に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

〔20〕〔17〕または〔18〕に記載のポリヌクレオチドまたは〔19〕に記載のベクターを保持する宿主細胞。

〔21〕以下の工程を含む〔1〕～〔16〕のいずれかに記載の抗体を作製する方法。

- (a) HLAを認識する抗体を調製する工程
- (b) (a)で調製した抗体の配列を基に、〔1〕～〔16〕のいずれかに記載の抗体をコードするポリヌクレオチドを作製する工程
- (c) (b)のポリヌクレオチドを含むベクターを作製する工程
- (d) (c)のベクターを宿主細胞に導入する工程
- (e) (d)の宿主細胞を培養する工程

〔22〕〔1〕～〔16〕のいずれかに記載の抗体を有効成分として含有する、細胞死誘導剤。

〔23〕B細胞又はT細胞に対する細胞死誘導であることを特徴とする、〔22〕に記載の細胞死誘導剤。

〔24〕B細胞又はT細胞が、活性化B細胞又は活性化T細胞である、〔23〕に記載の細胞死誘導剤。

〔25〕〔1〕～〔16〕のいずれかに記載の抗体を有効成分として含有する、細胞増殖抑制剤。

〔26〕〔1〕～〔16〕のいずれかに記載の抗体を有効成分として含有する、抗腫瘍剤。

〔27〕腫瘍が血液腫瘍である〔26〕に記載の抗腫瘍剤。

〔28〕〔1〕～〔16〕のいずれかに記載の抗体を有効成分として含有する、自己免疫疾患治療剤。

#### 【発明の効果】

##### 【0012】

HLA class IAを認識する低分子抗体(diabody)をsc(Fv)2へと構造改変することにより、本抗体の細胞死誘導活性を増強させるとともに、血中における安定性を高めることにある。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

##### 【0013】

本発明は、2つの重鎖可変領域及び2つの軽鎖可変領域を含み、ヒト白血球抗原(HLA)への結合活性を有する一本鎖ポリペプチドであることを特徴とする抗体を提供する。本発明における抗体は、活性が上昇している点で有用である。ここで、活性とは、抗体が抗原に結合することにより生じる生物学的作用をいう。具体的な例としては、細胞死誘導作用、アポトーシス誘導作用、細胞増殖抑制作用、細胞分化抑制作用、細胞分裂抑制作用、細胞増殖誘導作用、細胞分化誘導作用、細胞分裂誘導作用、細胞周期調節作用などを挙げることができるが、好ましくは細胞死誘導作用、細胞増殖抑制作用である。

##### 【0014】

細胞死誘導作用、細胞増殖抑制作用などの上記作用の対象となる細胞は特に限定されないが、血球系細胞や浮遊細胞が好ましい。血球系細胞の具体的な例としては、リンパ球(B細胞、T細胞)、好中球、好酸球、好塩基球、単球(好ましくは活性化した末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cell、PBMC))、ミエローマ細胞などを挙げることができるが、リンパ球(B細胞、T細胞)、ミエローマ細胞が好ましく、T細胞又はB細胞(特に

活性化したB細胞又は活性化したT細胞)が最も好ましい。浮遊細胞は、細胞を培養した際、細胞がガラスやプラスチックなどの培養器の表面に付着することなく、浮遊状態で増殖する細胞である。これに対し、接着細胞(付着細胞)とは、細胞を培養した際、ガラスやプラスチックなどの培養器の表面に付着する細胞である。

#### 【0015】

一般的に、全長抗HLA抗体では細胞死誘導活性を示す為には抗IgG抗体などでクロスリンクする必要があるが、本発明の抗体では抗IgG抗体でのクロスリンクがなくても細胞死誘導活性を示すことが可能である。

#### 【0016】

本発明の抗体が浮遊細胞に対して細胞死を誘導するか否かは、Jurkat細胞又はARH77細胞に対して細胞死を誘導するか否かにより判定することができ、抗体が接着細胞に対して細胞死を誘導するか否かは、HeLa細胞に対して細胞死を誘導するか否かにより判定することができる(PCT/JP03/13063)。

#### 【0017】

本発明においては、上記、2つの重鎖可変領域及び2つの軽鎖可変領域を含み、ヒト白血球抗原(HLA)への結合活性を有する一本鎖ポリペプチドであることを特徴とする抗体を投与することにより、例えば、血液腫瘍(造血器腫瘍)などの腫瘍(具体的な例として、白血病、骨髄異形成症候群、悪性リンパ腫、慢性骨髄性白血病、形質細胞異常症(骨髄腫、多発性骨髄腫、マクログロブリン血症)、骨髄増殖性疾患(真性赤血球増加症、本態性血小板血症、特発性骨髄線維症)など)や自己免疫疾患(具体的な例として、リウマチ、自己免疫性肝炎、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫性水疱症、自己免疫性副腎皮質炎、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少性紫斑病、自己免疫性萎縮性胃炎、自己免疫性好中球減少症、自己免疫性精巣炎、自己免疫性脳脊髄炎、自己免疫性レセプター病、自己免疫不妊、クローン病、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、バセドウ病、若年性糖尿病、アジソン病、重症筋無力症、水晶体性ブドウ膜炎、乾癬、ベーチェット病、など)のような疾患の治療、予防などをおこなうことが可能である。また、本発明の抗体は生体内での安定性に優れていると考えられる為、生体に投与する際には特に有効であると考えられる。

#### 【0018】

本発明において、HLAとは、ヒト白血球抗原を意味する。HLA分子はclassIとclassIIに分類され、classIとしてはHLA-A、B、C、E、F、G、H、Jなどが知られており、classIIとしてはHLA-DR、DQ、DPなどが知られている。本発明の抗体が認識する抗原はHLA分子であれば特に制限されないが、好ましくはclassIに分類される分子であり、より好ましくはHLA-Aである。

#### 【0019】

本発明の抗体としては、好ましくは、2つの重鎖可変領域及び2つの軽鎖可変領域が、一本鎖ポリペプチドのN末端側を基点として重鎖可変領域、軽鎖可変領域、重鎖可変領域、軽鎖可変領域の順に並んでいることを特徴とする抗体であり、より好ましくは、2つの重鎖可変領域及び2つの軽鎖可変領域がリンカーで結合されていることを特徴とする抗体であり、このような抗体としてはsc(Fv)2が例示できる。

#### 【0020】

sc(Fv)2は、2つの重鎖可変領域([VH])及び2つの軽鎖可変領域([VL])をリンカー等で結合して一本鎖ポリペプチドにした抗体である(Hudson et al, J Immunol. Methods 1999; 231: 177-189)。sc(Fv)2は、例えば、2つのscFv(シングルチェーンFv)(Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883、Plickthun「The Pharmacology of Monoclonal Antibodies」Vol.113, Resenbarg 及び Moore編, Springer Verlag, New York, pp.269-315, (1994))をリンカー等で結合することにより作製することが可能である。結合される2つの重鎖可変領域と2つの軽鎖可変領域の順序は特に限定されず、どのような順序で並べられていてもよく、例えば、以下のような配置を挙げることができる。

[VH] リンカー [VL] リンカー [VH] リンカー [VL]  
 [VL] リンカー [VH] リンカー [VH] リンカー [VL]  
 [VH] リンカー [VL] リンカー [VL] リンカー [VH]  
 [VH] リンカー [VH] リンカー [VL] リンカー [VL]  
 [VL] リンカー [VL] リンカー [VH] リンカー [VH]  
 [VL] リンカー [VH] リンカー [VL] リンカー [VH]

本発明においては、好ましくは、[VH] リンカー [VL] リンカー [VH] リンカー [VL] の配置を有する sc(Fv)<sub>2</sub> である。

#### 【0021】

重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、置換、欠失、付加及び／又は挿入されていてもよい。さらに、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を会合させた場合に、抗原結合活性を有する限り、一部を欠損させてもよいし、他のポリペプチドを付加してもよい。又、可変領域はキメラ化やヒト化されていてもよい。

#### 【0022】

本発明において、抗体の可変領域を結合するリンカーは、遺伝子工学により導入し得る任意のペプチドリリンカー、又は合成化合物リンカー、例えば、Protein Engineering, 9(3), 299-305, 1996に開示されるリンカーを用いることができる。

#### 【0023】

本発明において好ましいリンカーはペプチドリリンカーである。ペプチドリリンカーの長さは特に限定されず、目的に応じて当業者が適宜選択することが可能であるが、通常、1~100アミノ酸、好ましくは3~50アミノ酸、更に好ましくは5~30アミノ酸、特に好ましくは12~18アミノ酸（例えば、15アミノ酸）である。

#### 【0024】

ペプチドリリンカーのアミノ酸配列としては、例えば、以下のような配列を挙げることができる。

Ser  
 Gly · Ser  
 Gly · Gly · Ser  
 Ser · Gly · Gly  
 Gly · Gly · Gly · Ser  
 Ser · Gly · Gly · Gly  
 Gly · Gly · Gly · Gly · Ser  
 Ser · Gly · Gly · Gly · Gly  
 Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Ser  
 Ser · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly  
 Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Ser  
 Ser · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly  
 (Gly · Gly · Gly · Gly · Ser)<sub>n</sub>  
 (Ser · Gly · Gly · Gly · Gly)<sub>n</sub>

[nは1以上の整数である]等を挙げることができる。

#### 【0025】

合成化学物リンカー（化学架橋剤）は、ペプチドの架橋に通常用いられている架橋剤、例えば、N-ヒドロキスクシンイミド (NHS) ジスクシンイミジルスベレート (DSS)、ビス（スルホスクシンイミジル）スベレート (BS3)、ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）(DSP)、ジチオビス（スルホスクシンイミジルプロピオネート）(DTSSP)、エチレングリコールビス（スクシンイミジルスクシネート）(EGS)、エチレングリコールビス（スルホスクシンイミジルスクシネート）（スルホ-EGS）、ジスクシンイミジル酒石酸塩 (DST)、ジスルホスクシンイミジル酒石酸塩（スルホ-DST）、ビス [2-（スクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチル] スルホン (BSOCOES)、ビス [2-（スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチル] スルホン（スルホ-BSOCOES）など

であり、これらの架橋剤は市販されている。

#### 【0026】

4つの抗体可変領域を結合する場合には、通常、3つのリンカーが必要となるが、全て同じリンカーを用いてもよいし、異なるリンカーを用いてもよい。

#### 【0027】

本発明において、好ましいsc(Fv)2の例としては、以下の(a)～(i)のいずれかに記載の抗体が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

- (a) 配列番号：3、4、5に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する重鎖可変領域を含むsc(Fv)2。
- (b) 配列番号：6、7、8に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する軽鎖可変領域を含むsc(Fv)2。
- (c) 配列番号：3、4、5に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する重鎖可変領域および配列番号：6、7、8に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する軽鎖可変領域を含むsc(Fv)2。
- (d) 配列番号：10に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含むsc(Fv)2。
- (e) 配列番号：12に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含むsc(Fv)2。
- (f) 配列番号：10に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域および配列番号：12に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含むsc(Fv)2。
- (g) 配列番号：14に記載のアミノ酸配列を有するsc(Fv)2。
- (h) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列を有するsc(Fv)2。
- (i) (a)～(h)のいずれかに記載のアミノ酸配列において1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入され、かつ本発明の抗体と同等の活性を有するsc(Fv)2。

#### 【0028】

なお、配列番号：9、10はそれぞれ2D7重鎖可変領域の塩基配列、アミノ酸配列を示し、当該領域における、50番目～54番目がCDR1（配列番号：3）、69番目～85番目がCDR2（配列番号：4）、118番目～123番目がCDR3（配列番号：5）に相当する。また、配列番号：11、12はそれぞれ2D7軽鎖可変領域の塩基配列、アミノ酸配列を示し、当該領域における、46番目～55番目がCDR1（配列番号：6）、71番目～77番目がCDR2（配列番号：7）、110番目～118番目がCDR3（配列番号：8）に相当する。また、上記重鎖可変領域と軽鎖可変領域をリンカーでつないだscFVをコードするポリヌクレオチドの塩基配列を配列番号：13に、scFVのアミノ酸配列を配列番号：14に示し、本発明のsc(Fv)2をコードするポリヌクレオチドの塩基配列を配列番号：1に、sc(Fv)2のアミノ酸配列を配列番号：2に示す。

#### 【0029】

また、配列番号：2に記載のアミノ酸配列を有するsc(Fv)2または、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるCDR（又は可変領域）を有するsc(Fv)2を、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的としてヒト化（Humanized）、キメラ（Chimeric）化してもよい。これらの人為的に改変した抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

#### 【0030】

ここで「機能的に同等」とは、対象となる抗体が、配列番号：2に記載の配列を有するsc(Fv)2、または配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるCDR（又は可変領域）を有するsc(Fv)2と同等の活性（例えば、HLA-Aへの結合活性、細胞死誘導活性、など）を有することを意味する。

#### 【0031】

あるポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドを調製するための、当業者によく知られた方法としては、ポリペプチドに変異を導入する方法が知られている。例えば、当業者であれば、部位特異的変異誘発法（Hashimoto-Gotoh, T. et al. (1995) Gene 152, 271-275; Zoller, MJ, and Smith, M. (1983) Methods Enzymol. 100, 468-500; Kramer, W. et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456; Kramer W, and Fritz HJ (1987) Methods. Enzymol. 154, 350-367; Kunkel, TA (1985) Proc Natl Acad Sci USA. 82, 488-492

、Kunkel (1988) Methods Enzymol. 85, 2763-2766) などを用いて、本発明の抗体に適宜変異を導入することにより、該抗体と機能的に同等な抗体を調製することができる。また、アミノ酸の変異は自然界においても生じうる。このように、本発明の抗体のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が変異したアミノ酸配列を有し、該抗体と機能的に同等な抗体もまた本発明の抗体に含まれる。

#### 【0032】

変異するアミノ酸数は特に制限されないが、通常、30アミノ酸以内であり、好ましくは15アミノ酸以内であり、さらに好ましくは5アミノ酸以内（例えば、3アミノ酸以内）であると考えられる。変異するアミノ酸残基においては、アミノ酸側鎖の性質が保存されている別のアミノ酸に変異されることが望ましい。例えばアミノ酸側鎖の性質としては、疎水性アミノ酸（A、I、L、M、F、P、W、Y、V）、親水性アミノ酸（R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T）、脂肪族側鎖を有するアミノ酸（G、A、V、L、I、P）、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸（S、T、Y）、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸（C、M）、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸（D、N、E、Q）、塩基含有側鎖を有するアミノ酸（R、K、H）、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸（H、F、Y、W）を挙げることができる（括弧内はいずれもアミノ酸の一文字標記を表す）。あるアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するポリペプチドがその生物学的活性を維持することはすでに知られている（Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666、Zoller, M. J. & Smith, M. Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500、Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433、Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413）。

#### 【0033】

本発明の抗体には、本発明の抗体のアミノ酸配列に複数個のアミノ酸残基が付加された抗体も含まれる。また、これら抗体と他のペプチド又はタンパク質とが融合した融合タンパク質も含まれる。融合タンパク質を作製する方法は、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドと他のペプチド又はポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをフレームが一致するように連結してこれを発現ベクターに導入し、宿主で発現させればよく、当業者に公知の手法を用いることができる。本発明の抗体との融合に付される他のペプチド又はポリペプチドとしては、例えば、FLAG (Hopp, T. P. et al., BioTechnology (1988) 6, 1204-1210)、6個のHis（ヒスチジン）残基からなる6×His、10×His、インフルエンザ凝集素（HA）、ヒトc-mycの断片、VSV-GPの断片、p18HIVの断片、T7-tag、HSV-tag、E-tag、SV40T抗原の断片、lck tag、 $\alpha$ -tubulinの断片、B-tag、Protein Cの断片等の公知のペプチドを使用することができる。また、本発明の抗体との融合に付される他のポリペプチドとしては、例えば、GST（グルタチオン-S-トランスフェラーゼ）、HA（インフルエンザ凝集素）、イムノグロブリン定常領域、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、MBP（マルトース結合タンパク質）等が挙げられる。市販されているこれらペプチドまたはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドと融合させ、これにより調製された融合ポリヌクレオチドを発現させることにより、融合ポリペプチドを調製することができる。

#### 【0034】

本発明の抗体は、後述するそれを産生する細胞や宿主あるいは精製方法により、アミノ酸配列、分子量、等電点又は糖鎖の有無や形態などが異なり得る。しかしながら、得られた抗体が、本発明の抗体と同等の機能を有している限り、本発明に含まれる。例えば、本発明の抗体を原核細胞、例えば大腸菌で発現させた場合、本来の抗体のアミノ酸配列のN末端にメチオニン残基が付加される。本発明の抗体はこのような抗体も包含する。

#### 【0035】

本発明の抗体は、ポリエチレングリコール（PEG）、放射性物質、トキシン等の各種分子と結合したコンジュゲート抗体でもよい。このようなコンジュゲート抗体は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。なお、抗体の修飾方法はこの

分野においてすでに確立されている（例えば、US5057313、US5156840）。本発明における「抗体」にはこれらのコンジュゲート抗体も包含される。

#### 【0036】

また本発明は、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチド、または該ポリヌクレオチドとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ本発明の抗体と同等の活性を有する抗体をコードするポリヌクレオチドを提供する。本発明のポリヌクレオチドは、本発明の抗体をコードする限り、特に限定されず、複数のデオキシリボ核酸（DNA）またはリボ核酸（RNA）等の塩基または塩基対からなる重合体である。本発明のポリヌクレオチドは天然以外の塩基を含んでよい。本発明のポリヌクレオチドは、抗体を遺伝子工学的な手法により発現させる際に使用することができる。また本発明の抗体と同等な機能を有する抗体をスクリーニングする際に、プローブとして用いることもできる。即ち本発明の抗体をコードするポリヌクレオチド、またはその一部をプローブとして用い、ハイブリダイゼーション、遺伝子増幅技術（例えばPCR）等の技術により、該ポリヌクレオチドとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ本発明の抗体と同等の活性を有する抗体をコードするDNAを得ることができる。このようなDNAも本発明のポリヌクレオチドに含まれる。ハイブリダイゼーション技術（Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989）は当業者によく知られた技術である。ハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、低ストリンジントな条件が挙げられる。低ストリンジントな条件とは、ハイブリダイゼーション後の洗浄において、例えば42℃、0.1×SSC、0.1%SDSの条件であり、好ましくは50℃、0.1×SSC、0.1%SDSの条件である。より好ましいハイブリダイゼーションの条件としては、高ストリンジントな条件が挙げられる。高ストリンジントな条件とは、例えば65℃、5×SSC及び0.1%SDSの条件である。これらの条件において、温度を上げる程に高い相同性を有するポリヌクレオチドが効率的に得られることが期待できる。但し、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーに影響する要素としては温度や塩濃度など複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジエンシーを実現することが可能である。

#### 【0037】

これらハイブリダイゼーション技術や遺伝子増幅技術により得られるポリヌクレオチドがコードする、本発明の抗体と機能的に同等な抗体は、通常、これら抗体とアミノ酸配列において高い相同性を有する。本発明の抗体には、本発明の抗体と機能的に同等であり、かつ該抗体のアミノ酸配列と高い相同性を有する抗体も含まれる。高い相同性とは、アミノ酸レベルにおいて、通常、少なくとも50%以上の同一性、好ましくは75%以上の同一性、さらに好ましくは85%以上の同一性、さらに好ましくは95%以上の同一性を指す。ポリペプチドの相同性を決定するには、文献（Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80, 726-730）に記載のアルゴリズムにしたがえばよい。

#### 【0038】

本発明のsc(Fv)2は当業者に公知の方法により作製することができる。例えば、HLAを認識する抗体の配列を基に、当業者に公知の遺伝子組換え技術を用いて作製することが可能である。具体的には、HLAを認識する抗体の配列を基にsc(Fv)2をコードするポリヌクレオチドを構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させればよい（例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496 ; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515 ; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663 ; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 ; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137参照）。

#### 【0039】

HLAを認識する抗体の配列は、既に公知の抗体の配列を用いることが可能であり、又、HLAを抗原として、当業者に公知の方法により抗HLA抗体を作製し、その抗体の配列を取得して用いることも可能である。具体的には、例えば、以下のようにして行うことができる

。HLAタンパク質若しくはその断片を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞（ハイブリドーマ）をスクリーニングする。抗原の調製は公知の方法、例えばバキュロウイルスを用いた方法（WO98/46777など）等に準じて行うことができる。ハイブリドーマの作製は、たとえば、ミルステインらの方法（Kohler, G. and Milstein, C., *Methods Enzymol.* (1981) 73: 3-46）等に準じて行うことができる。抗原の免疫原性が低い場合には、アルブミン等の免疫原性を有する巨大分子と結合させ、免疫を行えばよい。その後、ハイブリドーマのmRNAから逆転写酵素を用いて抗体の可変領域（V領域）のcDNAを合成し、得られたcDNAの配列を公知の方法により解読すればよい。

#### 【0040】

HLAを認識する抗体は、HLAと結合する限り特に制限はなく、マウス抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ヒツジ抗体、ヒト抗体等を適宜用いることができる。又、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体なども使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

#### 【0041】

キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域からなる抗体等であり、マウス抗体の可変領域をコードするポリヌクレオチドをヒト抗体の定常領域をコードするポリヌクレオチドと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得ることができる。

#### 【0042】

ヒト化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている（欧州特許出願公開番号EP 125023、国際特許出願公開番号WO 96/02576参照）。具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域（framework region; FR）を連結するように設計したポリヌクレオチド配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する（国際特許出願公開番号WO98/13388号公報に記載の方法を参照）。得られたポリヌクレオチドをヒト抗体定常領域をコードするポリヌクレオチドと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号EP 239400、国際特許出願公開番号WO 96/02576参照）。CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい（Sato, K. et al., *Cancer Res.* (1993) 53, 851-856）。これらキメラ抗体やヒト化抗体などについては、sc(Fv)2にした後にキメラ化やヒト化等を行ってもよいし、キメラ化やヒト化等を行った後にsc(Fv)2にしてもよい。

#### 【0043】

また、ヒト抗体の取得方法も知られている。例えば、ヒトリンパ球をin vitroで所望の抗原または所望の抗原を発現する細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、抗原への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平1-59878参照）。また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を所望の抗原で免疫することで所望のヒト抗体を取得することができる（国際特許出願公開番号WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735参照）。さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体（scFv）としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することができる。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするポリヌクレオチド配列を決定することができる。抗原に結

合するscFvのポリヌクレオチド配列が明らかになれば、当該配列を適当な発現ベクターを  
作製し、ヒト抗体を取得することができる。これらの方法は既に衆知であり、WO 92/0104  
7, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388  
を参考にすることができる。

#### 【0044】

本発明の抗体は当業者に公知の方法により製造することができる。具体的には、目的と  
する抗体のDNAを発現ベクターへ組み込む。その際、発現制御領域、例えば、エンハンサ  
ー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現  
ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。その際には、適  
当な宿主と発現ベクターの組み合わせを使用することができる。

#### 【0045】

ベクターの例としては、M13系ベクター、pUC系ベクター、pBR322、pBluescript、pCR-S  
criptなどが挙げられる。また、cDNAのサブクローニング、切り出しを目的とした場合、  
上記ベクターの他に、例えば、pGEM-T、pDIRECT、pT7などが挙げられる。本発明の抗体を  
生産する目的においてベクターを使用する場合には、特に、発現ベクターが有用である。  
発現ベクターとしては、例えば、大腸菌での発現を目的とした場合は、ベクターが大腸菌  
で増幅されるような上記特徴を持つほかに、宿主をJM109、DH5 $\alpha$ 、HB101、XL1-Blueなど  
の大腸菌とした場合においては、大腸菌で効率よく発現できるようなプロモーター、例え  
ば、lacZプロモーター (Wardら, Nature (1989) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 242  
2-2427)、araBプロモーター (Betterら, Science (1988) 240, 1041-1043)、またはT7  
プロモーターなどを持っていることが不可欠である。このようなベクターとしては、上記  
ベクターの他にpGEX-5X-1 (ファルマシア社製)、「QIAexpress system」(キアゲン社製  
)、pEGFP、またはpET(この場合、宿主はT7 RNAポリメラーゼを発現しているBL21が好ま  
しい)などが挙げられる。

#### 【0046】

また、ベクターには、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列が含まれていてもよい。  
ポリペプチド分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場  
合、pelBシグナル配列 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379)を使用す  
ればよい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば塩化カルシウム法、エレクトロポレー  
ション法を用いて行うことができる。

#### 【0047】

大腸菌以外にも、例えば、本発明のポリペプチドを製造するためのベクターとしては、  
哺乳動物由来の発現ベクター (例えば、pcDNA3 (インビトロゲン社製)や、pEGF-BOS (Nu  
cleic Acids. Res.1990, 18(17),p5322)、pEF、pCDM8)、昆虫細胞由来の発現ベクター (例  
えば「Bac-to-BAC baculovirus expression system」(ギブコBRL社製)、pBacPAK8)  
、植物由来の発現ベクター (例えばpMH1、pMH2)、動物ウイルス由来の発現ベクター (例  
えば、pHSV、pMV、pAdexLcw)、レトロウイルス由来の発現ベクター (例えば、pZIPneo)  
、酵母由来の発現ベクター (例えば、「Pichia Expression Kit」(インビトロゲン社製  
)、pNV11、SP-Q01)、枯草菌由来の発現ベクター (例えば、pPL608、pKTH50)が挙げら  
れる。

#### 【0048】

CHO細胞、COS細胞、NIH3T3細胞等の動物細胞での発現を目的とした場合には、細胞内で  
発現させるために必要なプロモーター、例えばSV40プロモーター (Mulliganら, Nature (1979) 277, 108)、  
MMLV-LTRプロモーター、EF1 $\alpha$ プロモーター (Mizushimaら, Nucleic  
Acids Res. (1990) 18, 5322)、CMVプロモーターなどを持っていることが不可欠であり  
、細胞への形質転換を選抜するための遺伝子 (例えば、薬剤 (ネオマイシン、G418など)  
により判別できるような薬剤耐性遺伝子)を有すればさらに好ましい。このような特性を  
有するベクターとしては、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13など  
が挙げられる。

#### 【0049】

さらに、遺伝子を安定的に発現させ、かつ、細胞内での遺伝子のコピー数の増幅を目的とする場合には、核酸合成経路を欠損したCHO細胞にそれを相補するDHFR遺伝子を有するベクター（例えば、pCHOIなど）を導入し、メトトレキセート（MTX）により増幅させる方法が挙げられ、また、遺伝子の一過性の発現を目的とする場合には、SV40 T抗原を発現する遺伝子を染色体上に持つCOS細胞を用いてSV40の複製起点を持つベクター（pcDなど）で形質転換する方法が挙げられる。複製開始点としては、また、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス（BPV）等の由来のものを用いることもできる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ（APH）遺伝子、チミジンキナーゼ（TK）遺伝子、大腸菌キサンチンデアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Ecogpt）遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素（dhfr）遺伝子等を含むことができる。

#### 【0050】

一方、動物の生体内で本発明のポリヌクレオチドを発現させる方法としては、本発明のポリヌクレオチドを適当なベクターに組み込み、例えば、レトロウイルス法、リポソーム法、カチオニックリポソーム法、アデノウイルス法などにより生体内に導入する方法などが挙げられる。用いられるベクターとしては、例えば、アデノウイルスベクター（例えばpAdexlcw）やレトロウイルスベクター（例えばpZIPneo）などが挙げられるが、これらに制限されない。ベクターへの本発明のポリヌクレオチドの挿入などの一般的な遺伝子操作は、常法に従って行うことが可能である（Molecular Cloning, 5.61-5.63）。生体内への投与は、ex vivo法であっても、in vivo法であってもよい。

#### 【0051】

また、本発明は、本発明のベクターが導入された宿主細胞を提供する。本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、例えば、大腸菌や種々の動物細胞などを用いることが可能である。本発明の宿主細胞は、例えば、本発明の抗体の製造や発現のための産生系として使用することができる。ポリペプチド製造のための産生系は、in vitroおよびin vivoの産生系がある。in vitroの産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

#### 【0052】

真核細胞を使用する場合、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を宿主に用いることができる。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、CHO（J. Exp. Med. (1995) 108, 945）、COS、3T3、ミエローマ、BHK（baby hamster kidney）、HeLa、Vero、両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞（Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340）、あるいは昆虫細胞、例えば、Sf9、Sf21、Tn5が知られている。CHO細胞としては、特に、DHFR遺伝子を欠損したCHO細胞であるdhfr-CHO（Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220）やCHO K-1（Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275）を好適に使用することができる。動物細胞において、大量発現を目的とする場合には特にCHO細胞が好ましい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、カチオニックリポソームDOTAP（ベーリンガーマンハイム社製）を用いた方法、エレクトロポレーション法、リポフェクションなどの方法で行うことが可能である。

#### 【0053】

植物細胞としては、例えば、ニコチアナ・タバカム（Nicotiana tabacum）由来の細胞がポリペプチド生産系として知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス（Saccharomyces）属、例えば、サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）、糸状菌、例えば、アスペルギルス（Aspergillus）属、例えば、アスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger）が知られている。

#### 【0054】

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌（E. coli）、例えば、JM109、DH5 $\alpha$ 、HB101等が挙げられ、その他、枯草菌が知られている。

#### 【0055】

これらの細胞を目的とするポリヌクレオチドにより形質転換し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することにより抗体が得られる。培養は、公知の方法に従い行うことができる。例えば、動物細胞の培養液として、例えば、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができる。その際、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養してもよい。培養時の pH は、約 6~8 であるのが好ましい。培養は、通常、約 30~40℃ で約 15~200 時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌を加える。

#### 【0056】

一方、*in vivo* でポリペプチドを産生させる系としては、例えば、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。これらの動物又は植物に目的とするポリヌクレオチドを導入し、動物又は植物の体内でポリペプチドを産生させ、回収する。本発明における「宿主」とは、これらの動物、植物を包含する。

#### 【0057】

動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。また、哺乳類動物を用いる場合、トランスジェニック動物を用いることができる。

#### 【0058】

例えば、目的とするポリヌクレオチドを、ヤギ  $\beta$  カゼインのような乳汁中に固有に産生されるポリペプチドをコードする遺伝子との融合遺伝子として調製する。次いで、この融合遺伝子を含むポリヌクレオチド断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ移植する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が産生する乳汁から、目的の抗体を得ることができる。トランスジェニックヤギから産生されるポリペプチドを含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい (Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

#### 【0059】

また、昆虫としては、例えばカイコを用いることができる。カイコを用いる場合、目的のポリヌクレオチドを挿入したバキュロウイルスをカイコに感染させることにより、このカイコの体液から目的のポリペプチドを得ることができる (Susumu, M. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。

#### 【0060】

さらに、植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。タバコを用いる場合、目的のポリヌクレオチドを植物発現用ベクター、例えば pMON 530 に挿入し、このベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えば、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) に感染させ、本タバコの葉より所望のポリペプチドを得ることができる (Julian K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

#### 【0061】

これにより得られた本発明の抗体は、宿主細胞内または細胞外 (培地など) から単離し、実質的に純粋で均一な抗体として精製することができる。抗体の分離、精製は、通常の抗体の精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせれば抗体を分離、精製することができる。

#### 【0062】

クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えば HPLC、FPLC 等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。例えば、プロテインAを用いたカラムとして、Hyper D, POR OS, Sepharose F. F. (Pharmacia)等が挙げられる。本発明は、これらの精製方法を用い、高度に精製された抗体も包含する。

#### 【0063】

本発明において、調製された抗体の抗原結合活性(Antibodies A Laboratory Manual. E d Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)の測定には公知の手段を使用することができる。例えば、ELISA (酵素結合免疫吸着検定法)、EIA (酵素免疫測定法)、RIA (放射免疫測定法)あるいは蛍光免疫法などを用いることができる。

#### 【0064】

本発明者らは、本発明の抗体が細胞死を誘導することを見出した。この知見に基づき、本発明の抗体を有効成分として含有する、細胞死誘導剤または細胞増殖抑制剤を提供する。また、既に本発明者らは、抗HLA抗体を低分子化したDiabodyが、ヒト骨髓腫モデル動物に対して、抗腫瘍効果を有することを見出している(PCT/JP03/13063)。さらに、本発明の抗体の細胞死誘導活性は、活性化されたT細胞又はB細胞で特に効果が大きいと考えられる。従って、本発明の抗体は、Diabodyと同様に癌などの腫瘍(特に血液腫瘍)や自己免疫疾患の治療や予防に特に有効であると考えられる。本発明は、本発明の抗体を有効成分として含有する、抗腫瘍剤または自己免疫疾患治療剤もまた提供するものである。

#### 【0065】

本発明の抗体は、直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化した医薬組成物として投与を行うことも可能である。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤として経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤などと適宜組み合わせ、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが考えられる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

#### 【0066】

錠剤、カプセル剤に混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸のような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖又はサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油又はチェリーのような香味剤が用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記の材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。

#### 【0067】

注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80(TM)、HCO-50と併用してもよい。

#### 【0068】

油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

#### 【0069】

患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射などのほか、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、経皮的、または経口的に当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、該化合物がポリヌクレオチドによりコードされるものであれば、該ポリヌクレオチドを遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

#### 【0070】

本発明の抗体の投与量は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重60kgとして）においては、1日あたり約0.1から1000mg、好ましくは約1.0から50mg、より好ましくは約1.0から20mgであると考えられる。

#### 【0071】

非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重60kgとして）においては、通常、1日当たり約0.01から30mg、好ましくは約0.1から20mg、より好ましくは約0.1から10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合であると考えられる。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量、あるいは体表面積あたりに換算した量を投与することができる。

#### 【実施例】

#### 【0072】

以下、実施例に基づいて本発明を更に具体的に説明する。

【実施例1】 2D7 sc(Fv)2 型DIABODY発現ベクターの作製

HLA-IAに対する抗体2D7抗体は、単独ではミエローマ細胞株に対する細胞死誘導活性はほとんど観察されないが、細胞表面に結合している2D7抗体を二次抗体（抗マウスIgG）でクロスリンクすると、ミエローマ細胞株に対して細胞死を誘導し得ることを既に示した。さらに、2D7IgGから重鎖および軽鎖可変領域を5merのリンカーで接続したdiabody体（2D7 diabody）（図1A）に改変することにより、この細胞死誘導活性が劇的に上昇することも示した。そこで、この2D7diabodyを、より安定なsc(Fv)2型（図1B）に改変し、細胞死誘導活性を従来型diabody(HL5)と比較検討した。

#### 【0073】

まず、2D7抗体の重鎖可変領域配列（VH）と軽鎖可変領域配列（VL）が、VH-VL-VH-VLの並びになるように、それぞれを15merのリンカー（GlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySer GlyGlyGlyGlySer）で接続した2D7 sc(Fv)2をコードするDNA発現ベクターを以下の手順で作製した。

#### 【0074】

PCT/JP03/13063に記載の方法で作成した、VH-VLを5merのリンカー（GlyGlyGlyGlySer）で連結した2D7diabody(HL5)発現ベクターを鋳型にして、プライマー2D7DBH1（配列番号：15）、プライマー2D7PA2（配列番号：16）でPCR反応を行い、断片Aを増幅した。同様に、プライマー2D7PA3（配列番号：17）、プライマー2D7PA5（配列番号：18）でPCR反応を行い、断片Bを増幅した。ここで得られた断片A及び断片Bを、同一チューブ内で混合し、PCR-recombination反応を行うことで、断片Aと断片Bを連結させた。これにより、N末にVHのシグナル配列を含み、VH-VLが15merのリンカーで連結したDNA断片“2D7diabodyHL15-1”を得た。

#### 【0075】

続いて、2D7diabody(HL5)発現ベクターを鋳型にして、プライマー2D7PA6（配列番号：19）、プライマー2D7PA2（配列番号：16）でPCR反応を行い、断片Cを増幅した。同様に、プライマー2D7PA3（配列番号：17）、プライマー2D7DBL2（配列番号：20）でPCR反応を行い、断片Dを増幅した。ここで得られた断片C及び断片Dを同一チューブ内で混合し、PCR-recombination反応により、2つの断片を連結させた。この操作によって、VH-VLが15merのリンカーで連結し、C末にFlag-tag領域を含むDNA断片“2D7diabodyHL15-2”を得

た。

#### 【0076】

上記反応により得られた2つのDNA断片、すなわち "2D7diabodyHL15-1" DNA断片、及び、"2D7diabodyHL15-2" DNA断片を、それぞれEcoRI-BamHI、及び、BamHI-NotIで切断し、両DNA断片をあらかじめEcoRI-NotIで切断し開裂した発現ベクターpCXND3に挿入した。インサートDNAの塩基配列を解析し、目的どおりsignal-VH(15)VL(15)VH(15)VL-FlagをコードするcDNAが、pCXND3のEcoRI-NotI間に挿入されていることを確認し、2D7sc(Fv)2発現ベクター(pCXND3-2D7sc(Fv)2)の構築を終了した。2D7sc(Fv)2の塩基配列(配列番号: 1)およびアミノ酸配列(配列番号: 2)を図2に示す。

#### 【0077】

〔実施例2〕2D7sc(Fv)2産生発現細胞株の樹立

PvuIで切断し直鎖化したpCXND3-2D7sc(Fv)2 20 $\mu$ gをCHO細胞(DG44株)に以下のようにelectroporation法により導入した。

#### 【0078】

DG44細胞をice-cold PBSで2回洗浄した後 $1 \times 10^7$ /mlになるようにPBSに懸濁した。これに20 $\mu$ gの上記プラスミドを混合し、電気パルス(1.5KV, 25 $\mu$ FD)を与えた。適当な割合で細胞を希釈し96 well plateに細胞を撒きこみ、終濃度500 $\mu$ g/mlのG418(インビトロジェン)存在下で培養を行った。生育したコロニーを約30クローンほどピックアップし、それから培養上清中の2D7sc(Fv)2の発現量を抗FLAG抗体(シグマ)を用いたウエスタンブロットにより調べた。最も発現の高かったクローンを5nM MTXを含む核酸フリーのCHO-S-SFM II培地(インビトロジェン)で培養を行い、培養スケールを拡大した。その結果得られた株を高産生細胞株とした。

#### 【0079】

〔実施例3〕2D7sc(Fv)2の大量精製

T-125フラスコでサブコンフルエントの2D7sc(Fv)2高産生CHO細胞株を $1 \times 10^5$ /mlになるようにローラボトル(CHO-S-SFM II培地 250ml/ボトル)に移した。37℃で培養し、6日後に培養液を回収した。遠心によって死細胞を除去した後、0.45 $\mu$ mフィルターを通してこれを精製に用いた。

#### 【0080】

2D7sc(Fv)2の精製は以下のとおり行った。

まず、buffer A (20mM Na-phosphate pH6.8)で平衡化したHydroxyapatite カラム (micro prep ceramic Hydroxyapatite type I, Bio-Rad) に回収した培養上清をapplyした。buffer Aでカラムを洗浄した後、buffer C (250mM Na-phosphate pH6.8)で2D7sc(Fv)2を溶出した。2D7sc(Fv)2を含むフラクションを等量のbuffer Aで希釈した後、これをAnti-Flag M2アガロースアフィニティカラム (Bio-Rad) にApplyした。このカラムをbuffer C (50mM Tris-HCl pH7.4, 150mM NaCl, 0.01% Tween 20)で洗浄した後、Buffer D (100mM Glycine H3.5, 0.01% Tween 20)で2D7sc(Fv)2を溶出した。回収したサンプルは直ちに終濃度25mMになるようにTris-HCl pH8.0で中和した。その後、このフラクションを、セントリプレッブYM-10 (AMICON)で濃縮し、Superdex200HR (26/60)カラム (アマシャムファルマシア)によるゲルろ過精製に用いた。0.01% Tween 20を含むPBS中でサンプルを溶出し、分子量約52KDの2D7sc(Fv)2のfractionのみを回収した。回収したサンプルの一部をSDS電気泳動および銀染色を行い、目的の蛋白が精製されていることを確認した。これを濃縮し、2D7sc(Fv)2精製標品とした。

#### 【0081】

〔実施例4〕2D7sc(Fv)2による細胞死誘導実験

ARH77細胞を、 $1 \times 10^5$  cells/wellになるように24 well plateに細胞を撒いた。これに、精製した2D7sc(Fv)2を終濃度100ng/ml、及び、250ng/mlになるように添加した。また比較検体として、精製した2D7diabody (HL5)を別のwellに同一条件で添加した。37℃で3時間培養後、各細胞を回収し、PI溶液 (5 $\mu$ g/ml PI, 2% FCS/ PBS) に細胞を懸濁した。遮光して室温で15分インキュベートした後、flow cytometryを用いてPIで染色された死細胞

胞の割合を測定した (EPICS ELITE, COULTER)。

【0082】

その結果、2D7sc(Fv)2は濃度依存的に細胞死を誘導する活性を有していることが明らかになった。またその活性は、linker 5merでVHとVLをつないだ2D7diabody (HL5) とほぼ同レベルであることが分かった。以上の結果より、in vitroにおける細胞死誘導活性に関しては、2D7sc(Fv)2は2D7diabody (HL5) と同様の活性を有していることが分かった (図3)。

【図面の簡単な説明】

【0083】

【図1】 低分子抗体の模式図である。図1Aは2D7diabodyを、図1Bはsc(Fv)2型を示す。

【図2】 2D7sc(Fv)2の塩基配列とアミノ酸配列を示す図である。イタリック太字は重鎖可変領域のシグナル配列、下線で示した配列はリンカー領域 (15mer)、C末太字はFlagタグ領域を示す。枠で囲った塩基配列は5' 側から制限酵素EcoRI, BamHI, NotIの切断部位を示す。

【図3】 in vitroにおける細胞死誘導活性の結果を示す図である。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

&lt;120&gt; Inducer Of Cell Death

&lt;130&gt; C1-A0323

&lt;160&gt; 20

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1572

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (14)..(1561)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 1

cctgaattcc	acc	atg	cga	tgg	agc	tgg	atc	ttt	ctc	ttc	ctc	ctg	tca	49
		Met	Arg	Trp	Ser	Trp	Ile	Phe	Leu	Phe	Leu	Leu	Ser	
		1				5						10		

ata	act	gca	ggt	gtc	cat	tgc	cag	gtc	cag	ttg	cag	cag	tct	gga	cct	97
Ile	Thr	Ala	Gly	Val	His	Cys	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	
		15					20					25				

gag	ctg	gtg	aag	cct	ggg	gct	tca	gtg	aag	atg	tct	tgt	aag	gct	tct	145
Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	
	30					35					40					

ggc	tac	acc	ttc	aca	gac	tac	ttt	ata	cac	tgg	gtg	aaa	cag	agg	cct	193
Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Phe	Ile	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	
	45				50					55				60		

gga	cag	gga	ctt	gaa	tgg	att	gga	tgg	att	ttt	cct	gga	gat	gat	act	241
Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Trp	Ile	Phe	Pro	Gly	Asp	Asp	Thr	
			65					70					75			

act	gat	tac	aat	gag	aag	ttc	agg	ggc	aag	acc	aca	ctg	act	gca	gac	289
Thr	Asp	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Arg	Gly	Lys	Thr	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	
			80					85						90		

aaa	tcc	tcc	agc	aca	gcc	tac	att	ttg	ctc	agc	agc	ctg	acc	tct	gag	337
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Ile	Leu	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu		
		95					100					105					
gac	tct	gcg	atg	tat	ttc	tgt	gta	agg	agt	gac	gac	ttt	gac	tac	tgg	385	
Asp	Ser	Ala	Met	Tyr	Phe	Cys	Val	Arg	Ser	Asp	Asp	Phe	Asp	Tyr	Trp		
		110				115					120						
ggc	cag	ggc	acc	act	ctc	aca	gtc	tcc	tca	ggg	gga	ggc	ggg	tca	ggc	433	
Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly		
		125			130					135					140		
gga	ggg	ggc	tct	ggc	ggg	ggc	gga	agc	caa	att	gtt	ctc	acc	cag	tgc	481	
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser		
				145					150					155			
cca	gca	atc	atg	tct	gca	tct	cca	ggg	gag	aag	gtc	acc	ata	acc	tgc	529	
Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Ile	Thr	Cys		
			160					165						170			
agt	gcc	agc	tca	agt	gta	agt	tac	atg	cac	tgg	ttc	cag	cag	aag	cca	577	
Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro		
		175					180					185					
ggc	act	ttt	ccc	aaa	ctc	tgg	att	tat	agc	aca	tcc	aac	ctg	gct	tct	625	
Gly	Thr	Phe	Pro	Lys	Leu	Trp	Ile	Tyr	Ser	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser		
		190				195					200						
gga	gtc	cct	act	cgc	ttc	agt	ggc	agt	gga	tct	ggg	acc	tct	tac	tct	673	
Gly	Val	Pro	Thr	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser		
		205			210					215					220		
ctc	aca	atc	agc	cga	atg	gag	gct	gaa	gat	gct	gcc	act	tat	tac	tgc	721	
Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys		
				225					230					235			
cag	caa	agg	acg	agt	tat	cca	ccc	acg	ttc	ggc	tcg	ggg	aca	aag	ttg	769	
Gln	Gln	Arg	Thr	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu		
			240					245					250				
gag	ata	aaa	gga	ggg	ggg	ggc	agt	ggg	ggc	ggc	gga	tcc	ggg	ggc	ggg	817	
Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly		
		255					260					265					
ggc	tca	cag	gtc	cag	ttg	cag	cag	tct	gga	cct	gag	ctg	gtg	aag	cct	865	
Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro		
		270				275					280						
ggg	gct	tca	gtg	aag	atg	tct	tgt	aag	gct	tct	ggc	tac	acc	ttc	aca	913	
Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr		
		285			290					295					300		

gac tac ttt ata cac tgg gtg aaa cag agg cct gga cag gga ctt gaa 961  
 Asp Tyr Phe Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu  
 305 310 315

tgg att gga tgg att ttt cct gga gat gat act act gat tac aat gag 1009  
 Trp Ile Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Thr Thr Asp Tyr Asn Glu  
 320 325 330

aag ttc agg ggc aag acc aca ctg act gca gac aaa tcc tcc agc aca 1057  
 Lys Phe Arg Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr  
 335 340 345

gcc tac att ttg ctc agc agc ctg acc tct gag gac tct gcg atg tat 1105  
 Ala Tyr Ile Leu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Met Tyr  
 350 355 360

ttc tgt gta agg agt gac gac ttt gac tac tgg ggc cag ggc acc act 1153  
 Phe Cys Val Arg Ser Asp Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 365 370 375 380

ctc aca gtc tcc tca ggt gga ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc 1201  
 Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 385 390 395

ggt ggc gga agc caa att gtt ctc acc cag tcg cca gca atc atg tct 1249  
 Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser  
 400 405 410

gca tct cca ggg gag aag gtc acc ata acc tgc agt gcc agc tca agt 1297  
 Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser  
 415 420 425

gta agt tac atg cac tgg ttc cag cag aag cca ggc act ttt ccc aaa 1345  
 Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Phe Pro Lys  
 430 435 440

ctc tgg att tat agc aca tcc aac ctg gct tct gga gtc cct act cgc 1393  
 Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Thr Arg  
 445 450 455 460

ttc agt ggc agt gga tct ggg acc tct tac tct ctc aca atc agc cga 1441  
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg  
 465 470 475

atg gag gct gaa gat gct gcc act tat tac tgc cag caa agg acg agt 1489  
 Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Thr Ser  
 480 485 490

tat cca ccc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg gag ata aaa gac tac 1537

Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr  
 495 500 505

aag gat gac gac gat aag tga taa gcggccgcaa t 1572  
 Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
 510

<210> 2  
 <211> 514  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 2  
 Met Arg Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Ile Thr Ala Gly  
 1 5 10 15  
 Val His Cys Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys  
 20 25 30  
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 35 40 45  
 Thr Asp Tyr Phe Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu  
 50 55 60  
 Glu Trp Ile Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Thr Thr Asp Tyr Asn  
 65 70 75 80  
 Glu Lys Phe Arg Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser  
 85 90 95  
 Thr Ala Tyr Ile Leu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Met  
 100 105 110  
 Tyr Phe Cys Val Arg Ser Asp Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 115 120 125  
 Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 130 135 140  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met  
 145 150 155 160  
 Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser  
 165 170 175  
 Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Phe Pro  
 180 185 190

Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Thr  
 195 200 205  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser  
 210 215 220  
 Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Thr  
 225 230 235 240  
 Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly  
 245 250 255  
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val  
 260 265 270  
 Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val  
 275 280 285  
 Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Phe Ile  
 290 295 300  
 His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp  
 305 310 315 320  
 Ile Phe Pro Gly Asp Asp Thr Thr Asp Tyr Asn Glu Lys Phe Arg Gly  
 325 330 335  
 Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Ile Leu  
 340 345 350  
 Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys Val Arg  
 355 360 365  
 Ser Asp Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser  
 370 375 380  
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 385 390 395 400  
 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly  
 405 410 415  
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 420 425 430  
 His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Phe Pro Lys Leu Trp Ile Tyr  
 435 440 445  
 Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Thr Arg Phe Ser Gly Ser  
 450 455 460

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu  
465 470 475 480

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Thr Ser Tyr Pro Pro Thr  
485 490 495

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp  
500 505 510

Asp Lys

<210> 3  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 3  
Asp Tyr Phe Ile His  
1 5

<210> 4  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 4  
Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Thr Thr Asp Tyr Asn Glu Lys Phe Arg  
1 5 10 15

Gly

<210> 5  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 5  
Ser Asp Asp Phe Asp Tyr  
1 5

<210> 6  
<211> 10  
<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His  
1 5 10

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser  
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Gln Gln Arg Thr Ser Tyr Pro Pro Thr  
1 5

<210> 9

<211> 402

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(402)

<223>

<400> 9

atg cga tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca ata act gca ggt 48  
Met Arg Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Ile Thr Ala Gly  
1 5 10 15

gtc cat tgc cag gtc cag ttg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag 96  
Val His Cys Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys  
20 25 30

cct ggg gct tca gtg aag atg tct tgt aag gct tct ggc tac acc ttc 144  
Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
35 40 45

aca gac tac ttt ata cac tgg gtg aaa cag agg cct gga cag gga ctt 192  
 Thr Asp Tyr Phe Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu  
 50 55 60

gaa tgg att gga tgg att ttt cct gga gat gat act act gat tac aat 240  
 Glu Trp Ile Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Thr Thr Asp Tyr Asn  
 65 70 75 80

gag aag ttc agg ggc aag acc aca ctg act gca gac aaa tcc tcc agc 288  
 Glu Lys Phe Arg Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser  
 85 90 95

aca gcc tac att ttg ctc agc agc ctg acc tct gag gac tct gcg atg 336  
 Thr Ala Tyr Ile Leu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Met  
 100 105 110

tat ttc tgt gta agg agt gac gac ttt gac tac tgg ggc cag ggc acc 384  
 Tyr Phe Cys Val Arg Ser Asp Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 115 120 125

act ctc aca gtc tcc tca 402  
 Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 130

<210> 10

<211> 134

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Met Arg Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Ile Thr Ala Gly  
 1 5 10 15

Val His Cys Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys  
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 35 40 45

Thr Asp Tyr Phe Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Thr Thr Asp Tyr Asn  
 65 70 75 80

Glu Lys Phe Arg Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser  
 85 90 95

Thr Ala Tyr Ile Leu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Met  
 100 105 110

Tyr Phe Cys Val Arg Ser Asp Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 115 120 125

Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 130

<210> 11  
 <211> 384  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(384)  
 <223>

<400> 11  
 atg cat ttt caa gtg cag att ttc agc ttc ctg cta atc agt gcc tca 48  
 Met His Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser  
 1 5 10 15

gtc atc atg tcc aga gga caa att gtt ctc acc cag tcg cca gca atc 96  
 Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile  
 20 25 30

atg tct gca tct cca ggg gag aag gtc acc ata acc tgc agt gcc agc 144  
 Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser  
 35 40 45

tca agt gta agt tac atg cac tgg ttc cag cag aag cca ggc act ttt 192  
 Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Phe  
 50 55 60

ccc aaa ctc tgg att tat agc aca tcc aac ctg gct tct gga gtc cct 240  
 Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 65 70 75 80

act cgc ttc agt ggc agt gga tct ggg acc tct tac tct ctc aca atc 288  
 Thr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile  
 85 90 95

agc cga atg gag gct gaa gat gct gcc act tat tac tgc cag caa agg 336  
 Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg  
 100 105 110

acg agt tat cca ccc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg gag ata aaa 384

Thr Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
115 120 125

<210> 12  
<211> 128  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 12  
Met His Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile  
20 25 30

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser  
35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Phe  
50 55 60

Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
65 70 75 80

Thr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile  
85 90 95

Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg  
100 105 110

Thr Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
115 120 125

<210> 13  
<211> 792  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(792)  
<223>

<400> 13  
atg cga tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca ata act gca ggt 48  
Met Arg Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Ile Thr Ala Gly  
1 5 10 15

gtc cat tgc cag gtc cag ttg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag 96  
 Val His Cys Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys  
 20 25 30

cct ggg gct tca gtg aag atg tct tgt aag gct tct ggc tac acc ttc 144  
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 35 40 45

aca gac tac ttt ata cac tgg gtg aaa cag agg cct gga cag gga ctt 192  
 Thr Asp Tyr Phe Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu  
 50 55 60

gaa tgg att gga tgg att ttt cct gga gat gat act act gat tac aat 240  
 Glu Trp Ile Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Thr Thr Asp Tyr Asn  
 65 70 75 80

gag aag ttc agg ggc aag acc aca ctg act gca gac aaa tcc tcc agc 288  
 Glu Lys Phe Arg Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser  
 85 90 95

aca gcc tac att ttg ctc agc agc ctg acc tct gag gac tct gcg atg 336  
 Thr Ala Tyr Ile Leu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Met  
 100 105 110

tat ttc tgt gta agg agt gac gac ttt gac tac tgg ggc cag ggc acc 384  
 Tyr Phe Cys Val Arg Ser Asp Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 115 120 125

act ctc aca gtc tcc tca ggt gga ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct 432  
 Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 130 135 140

ggc ggt ggc gga agc caa att gtt ctc acc cag tcg cca gca atc atg 480  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met  
 145 150 155 160

tct gca tct cca ggg gag aag gtc acc ata acc tgc agt gcc agc tca 528  
 Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser  
 165 170 175

agt gta agt tac atg cac tgg ttc cag cag aag cca ggc act ttt ccc 576  
 Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Phe Pro  
 180 185 190

aaa ctc tgg att tat agc aca tcc aac ctg gct tct gga gtc cct act 624  
 Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Thr  
 195 200 205

cgc ttc agt ggc agt gga tct ggg acc tct tac tct ctc aca atc agc 672  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser

210 215 220

cga atg gag gct gaa gat gct gcc act tat tac tgc cag caa agg acg 720  
 Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Thr  
 225 230 235 240

agt tat cca ccc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg gag ata aaa gac 768  
 Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp  
 245 250 255

tac aag gat gac gac gat aag tga 792  
 Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
 260

<210> 14  
 <211> 263  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 14  
 Met Arg Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Ile Thr Ala Gly  
 1 5 10 15

Val His Cys Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys  
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 35 40 45

Thr Asp Tyr Phe Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Thr Thr Asp Tyr Asn  
 65 70 75 80

Glu Lys Phe Arg Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser  
 85 90 95

Thr Ala Tyr Ile Leu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Met  
 100 105 110

Tyr Phe Cys Val Arg Ser Asp Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 115 120 125

Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met  
 145 150 155 160

Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser  
 165 170 175

Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Phe Pro  
 180 185 190

Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Thr  
 195 200 205

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser  
 210 215 220

Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Thr  
 225 230 235 240

Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp  
 245 250 255

Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
 260

<210> 15

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 15

cctgaattcc accatgcat ggagctggat ctttc

35

<210> 16

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 16

accgccagag ccacctccgc ctgaaccgcc tccacctgag gagactgt

48

<210> 17

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 17

ttcaggcgga ggtggctctg gcggtggcgg aagccaaatt gttctcaccc agtcgcc 57

<210> 18

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 18

accgatccg ccgccaccac tgccaccacc tccttttata tccaactttg tccccgagcc 60

gaa 63

<210> 19

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 19

ggcggatccg gtggcgttg ctcacaggtc cagttgcagc agtctggacc 50

<210> 20

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 20

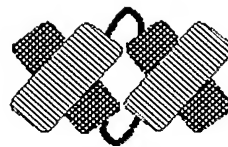
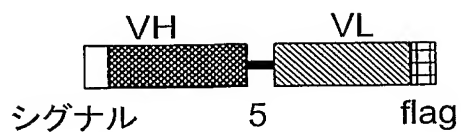
attgcggccg cttatcactt atcgtcgtca tccttgtagt cttttatctc caactttgtc 60

cccagagcc 68

【書類名】 図面

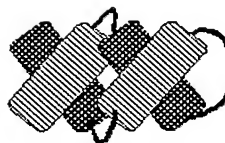
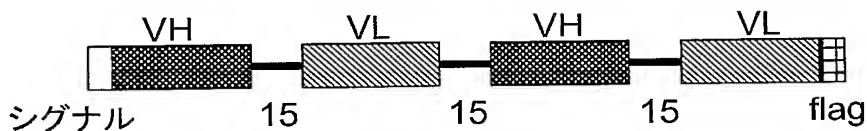
【図 1】

**A**



diobody  
(HL5)

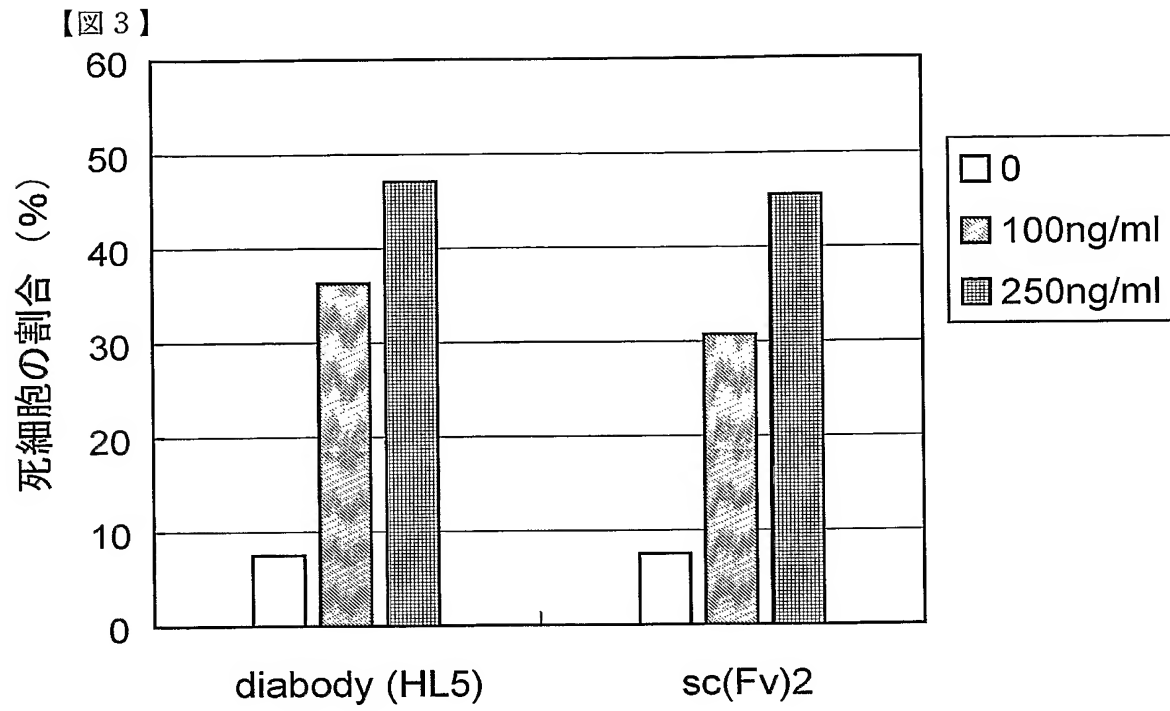
**B**



sc(Fv)2

【図 2】

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
CCTgaattgca	CCATGCGATGGAGCTGGATCTTTCTCTTCTCCTGTCAATAACTGCAGGTGCCATTGCCAGGTCCAGTTGCAGCAGTCTGGACCTGAG								
	M R W S W I F L F L L S I T A G V H C Q V Q L Q Q S G P E								
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
CTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCTTGTGAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACAGACTACTTTATACACTGGGTGAAACAGAGGCCTGGACAGG									
L V K P G A S V K M S C K A S G Y T F T D Y F I H W V K Q R P G Q G									
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
GACTTGAATGGATTGGATGGATTTTCTGGAGATGATACTACTGATTACAATGAGAAGTTCAGGGGCAAGACCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAG									
L E W I G W I F P G D D T T D Y N E K F R G K T T L T A D K S S S									
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
CACAGCCTACATTTTGTCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGATGTATTCTGTGAAGGAGTGACGACTTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCAGT									
T A Y I L L S S L T S E D S A M Y F G V R S D D F D Y W G Q G T T									
410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
CTCACAGTCTCCTCAggtggaggcggttcaggcgagggtggctctggcggtggcggaagcCAAATTGTTCTCACCCAGTCGCCAGCAATCATGTCTGCAT									
L T V S S G G G G S G G G G S G G G G S Q I V L T Q S P A I M S A S									
510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
CTCCAGGGGAGAAGGTCACCATACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTTCAGCAGAAGCCAGGCACCTTTCCCAAACCTCTGGAT									
P G E K V T I T C S A S S S V S Y M H W F Q Q K P G T F P K L W I									
610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
TTATAGCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTACTCGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAAATCAGCCGAATGGAGGCTGAA									
Y S T S N L A S G V P T R F S G S G S G T S Y S L T I S R M E A E									
710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
GATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAAAGGACGAGTTATCCACCCACGTTCCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAGATAAAAggaggtgggtggcagtggtggcg									
D A A T Y Y C Q Q R T S Y P P T F G S G T K L E I K G G G G S G G G									
810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
gcggatccggtggcggtggctcaCAGGTCCAGTTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCTTGTAAAGGCTTCTGG									
G S G G G G S Q V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K M S C K A S G									
910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
CTACACCTTCACAGACTACTTTATACACTGGGTGAAACAGAGGCCTGGACAGGGACTTGAATGGATTGGATGGATTTTCTGGAGATGATACTACTGAT									
Y T F T D Y F I H W V K Q R P G Q G L E W I G W I F P G D D T T D									
1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
TACAATGAGAAGTTCAGGGGCAAGACCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATTTTGTCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGA									
Y N E K F R G K T T L T A D K S S S T A Y I L L S S L T S E D S A M									
1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
TGTATTTCTGTGAAGGAGTGACGACTTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCAGTCTCACAGTCTCCTCAggtggaggcggttcaggcgagggtggctctgg									
Y F C V R S D D F D Y W G Q G T T L T V S S G G G G S G G G G S G									
1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
cggtggcggaagcCAAATTGTTCTCACCCAGTCGCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTACCATAACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTA									
G G G S Q I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T I T C S A S S S V									
1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
AGTTACATGCACTGGTTCAGCAGAAGCCAGGCACCTTTCCCAAACCTCTGGATTTATAGCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTACTCGCTTCAGTG									
S Y M H W F Q Q K P G T F P K L W I Y S T S N L A S G V P T R F S G									
1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500
GCAGTGGATCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCCGAATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAAAGGACGAGTTATCCACCCAC									
S G S G T S Y S L T I S R M E A E D A A T Y Y C Q Q R T S Y P P T									
1510	1520	1530	1540	1550	1560	1570	1580		
GTTCCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAGATAAAAgactacaaggatgacgacgataagtataaagcgccgcaat									
F G S G T K L E I K D Y K D D D D K * *									



**【書類名】 要約書****【要約】**

**【課題】** 本発明は、HLA class IAを認識する活性の高い抗体を提供することを課題とする。詳しくは、2つ以上の重鎖可変領域と、2つ以上の軽鎖可変領域をリンカーで結合し、一本鎖ポリペプチドとしたsc(Fv)2を提供することを課題とする。

**【解決手段】** 本発明者らは2D7抗体の重鎖可変領域配列 (VH) と軽鎖可変領域配列 (VL) が、VH-VL-VH-VLの並びになるように、それぞれを15merのリンカーで接続した2D7 sc(Fv)2をコードするDNA発現ベクターを構築し、該ベクターをCHO細胞に導入して2D7sc(Fv)2産生発現細胞株を樹立した。該細胞株で発現させた2D7sc(Fv)2を精製し、細胞死誘導実験を行なったところ、2D7sc(Fv)2は濃度依存的に細胞死を誘導する活性を有していることが明らかになった。

**【選択図】** なし

【書類名】 手続補正書  
【整理番号】 C1-A0323  
【提出日】 平成16年12月10日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【事件の表示】  
    【出願番号】 特願2003-415758  
【補正をする者】  
    【識別番号】 000003311  
    【氏名又は名称】 中外製薬株式会社  
【代理人】  
    【識別番号】 100102978  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 清水 初志  
【手続補正1】  
    【補正対象書類名】 特許願  
    【補正対象項目名】 発明者  
    【補正方法】 変更  
    【補正の内容】  
        【発明者】  
        【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 - 2 中外製薬株式会社内  
        【氏名】 木村 直紀  
        【発明者】  
        【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内  
        【氏名】 土屋 政幸  
【その他】 本補正書で補正する理由は、発明者として「木村直紀」「土屋政幸」の2名を記載すべきところを出願時に誤って「木村直紀」「織田哲郎」「土屋政幸」の3名を記載してしまった為であります。

## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 4 1 5 7 5 8
受付番号	5 0 4 0 2 1 1 1 6 9 7
書類名	手続補正書
担当官	岩谷 貴志郎 7 7 4 6
作成日	平成 1 7 年 2 月 1 4 日

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

## 【補正をする者】

## 【識別番号】

000003311

## 【住所又は居所】

東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号

## 【氏名又は名称】

中外製薬株式会社

## 【代理人】

申請人

## 【識別番号】

100102978

## 【住所又は居所】

茨城県土浦市卸町 1 - 1 - 1 関鉄つくばビル 6

階 清水国際特許事務所

## 【氏名又は名称】

清水 初志

特願 2 0 0 3 - 4 1 5 7 5 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 3 3 1 1 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 9 月 5 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号

氏 名

中外製薬株式会社